



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E
CIÊNCIA DE ALIMENTOS



Área de Concentração: Ciência de Alimentos

APLICAÇÃO DE TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS E
MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS NA DIFERENCIAÇÃO DE
CANELA VERDADEIRA E CANELA FALSA

Autor: Júlia dos Santos Lopes

Orientador: Prof.DSc. Leandro Soares Santos

Itapetinga
2021

JÚLIA DOS SANTOS LOPES

**APLICAÇÃO DE TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS E
MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS NA DIFERENCIAÇÃO DE
CANELA VERDADEIRA E CANELA FALSA**

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, no Programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

Orientador: Prof. DSc. Leandro Soares Santos.

Co-orientadoras: Profa. Dra. Sibelli Passini Barbosa Ferrão

Profa. Dra. Cristiane Martins Veloso

Itapetinga
2021

633.83

L853a Lopes, Júlia dos Santos

Aplicação de técnicas espectroscópicas e métodos quimiométricos na diferenciação de canela verdadeira e canela falsa. / Júlia dos Santos Lopes. - Itapetinga: UESB, 2021.

50f.

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, no Programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Sob a orientação do Prof. D. Sc. Leandro Soares Santos e coorientação da Prof^a. D. Sc. Sibelli Passini Barbosa Ferrão e Prof^a. D. Sc. Cristiane Martins Veloso.

1. Especiaria – Autenticidade - Quimiometria. 2. Canela verdadeira. 3. Canela falsa. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. II. Santos, Leandro Soares. III. Ferrão, Sibelli Passini Barbosa. IV. Veloso, Cristiane Martins. V. Título.

CDD(21): 633.83

Catálogo na fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB/5-535

Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para Desdobramento por Assunto:

1. Autenticidade - Canela – Técnica MIR e CLAE
2. Canela – Autenticidade - Quimiometria



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB
Reconhecida pelo Decreto Estadual
Nº 18.825, de 04.07.2016



Governo do
Estado da Bahia

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: APLICAÇÃO DE TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS E MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS NA DIFERENCIAÇÃO DE CANELA VERDADEIRA E CANELA FALSA.

Autor (a): JÚLIA DOS SANTOS LOPES

Orientador (a): Prof. Dr. Leandro Soares Santos


Coorientador (a): Prof.^a Dr.^a Sibelli Passini Barbosa Ferrão

Prof.^a Dr.^a Cristiane Martins Veloso

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de *MESTRE EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIÊNCIA DE ALIMENTOS*, pela Banca Examinadora.


Prof.^a Dr.^a Ellen Cristina Quirino Lacerda
Membro Externo - UFRJ


Prof. Dr. Marcondes Viana da Silva
UESB


Prof. Dr. Leandro Soares Santos
Orientador - UESB
Presidente da Banca

Itapetinga-BA, 26 de fevereiro de 2021.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por sempre iluminar meu caminho, me proteger e me guiar. Por sempre estar presente abençoando as minhas escolhas e por tornar essa caminhada possível e única com sua presença. Obrigada por todo seu amor que chega até mim de diversas formas.

Agradeço aos meus pais Luís Antônio e Roselita pela melhor criação que eu poderia ter recebido. Obrigada por sempre confiarem em mim, essa vitória com certeza é nossa e eu dedico à vocês!! Obrigada por todo apoio, carinho e amor que recebo de vocês até hoje.

À minha família agradeço por todo apoio e por sempre acreditarem em mim. Às minhas amigas irmãs Amanda, Olívia e Amandinha. Às amigas que Itapetinga me deu e que vou levar por toda a vida Malú, Andressa e Nay. Um agradecimento especial à minha grande amiga Roberta que esteve tão presente nessa caminhada, me apoiando, me ouvindo e me ajudando, que sorte a nossa essa amizade amiga!!

Ao meu namorado Jackson por sempre estar presente mesmo distante, por ser companheiro, por me ouvir, por me dar conselhos e por todo cuidado, carinho e amor!

À toda equipe do Laboratório 9 Amanda, Acsa, Beta, Renata, Ramile, Sthefany, Keko, Clara e Thinaara pela troca de experiência, apoio, cafés e momentos compartilhados.

Ao meu grande orientador Leandro Soares por acreditar em mim, por me orientar e me ensinar. Agradeço a grande paciência e por acreditar e tornar possível minha evolução. Obrigada de verdade por tudo que me ensinou e por eu fazer parte, com orgulho, da sua equipe por todos esses anos!!

À minha Co-orientadora Sibelli Ferrão por compartilhar conhecimentos, ensinamentos e contribuições. Ao professor Marcondes pelas contribuições.

Aos integrantes da banca examinadora pelas contribuições e disponibilidade.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos pela oportunidade. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos.

Muito Obrigada!!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE FIGURAS	9
RESUMO	11
ABSTRACT.....	12
1.INTRODUÇÃO GERAL	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1Canela: aspectos gerais.....	15
2.2Canela verdadeira e Canela falsa	16
2.2.1 Composição fenólica das variedades de canela.....	19
2.2.2 Principais compostos indicadores químicos das variedades de canela	20
2.3 Fraude Alimentar em especiarias	23
2.4 Espectroscopia por Infravermelho	25
2.5 Quimiometria	26
3. OBJETIVOS GERAIS	28
3.1 Objetivo Geral.....	28
3.2 Objetivos Específicos.....	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 Coleta, diferenciação e preparo das amostras	29
4.2Preparo do extrato para as análises espectrofotométricas	29
4.3 Compostos Fenólicos Totais - CFT.....	29
4.4Flavonoides Totais - FT	30

4.5	Determinação de taninos condensados.....	30
4.6	Determinação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> (2,2-Difenil-1-picrilhidrazil-DPPH).....	31
4.7	Determinação da atividade pelo método da co-oxidação do sistema β -caroteno:ácido linoleico – BCAL	31
4.8	Quantificação de compostos fenólicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD).....	32
4.9	Espectroscopia de Infravermelho Médio -MIR.....	33
4.10	Análises Quimiométricas	33
4.10.1	Análise de Componentes Principais (ACP).....	33
4.10.2	Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA).....	34
4.11	Comparação entre o método CLAE-DAD e o MIR	34
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1	Análise visual das amostras de canela.....	35
5.2	Teor de constituintes bioativos, atividade antioxidante e fenólicos por CLAE-DAD das amostras de canela.....	35
5.3	Espectroscopia de Infravermelho Médio- MIR.....	38
5.4	Análise de Componentes Principais (ACP).....	40
5.5	Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA).....	43
6.	CONCLUSÕES.....	46
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Produção mundial de canela no ano de 2018.....	16
Tabela 2 -Principais diferenças entre os tipos de canela.	17
Tabela 3 - Composição nutricional de duas espécies de canela.	18
Tabela 4 - Principais compostos fenólicos das variedades de canela detectados por cromatografia.....	19
Tabela 5 – Valores obtidos pelos métodos de referência para as amostras de canela nos conjuntos de canela verdadeira e canela falsa.	36
Tabela 6 - Principais regiões espectrais do MIR baseadas nos padrões de Ácido Cafeico, Catequina, Epicatequina, Quercetina, Cinamaldeído, Eugenol e Cumarina presentes nas amostras de canela.	39
Tabela 7 – Capacidade de classificação, sensibilidade e seletividade dos modelos binários para amostras de canela verdadeira e canela falsa gerados com dados de constituintes bioativos, atividade antioxidante, e CLAE-DAD e dados gerados por MIR.	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Canela verdadeira (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>). Fonte: Duarte, 2014.	15
Figura 2- Morfologia da canela verdadeira (Ae C) e canela falsa (B e D). Fonte: Farag et al., 2018.	17
Figura 3- Estrutura química do eugenol. Fonte: Santos et al., 2017.	21
Figura 4- Estrutura química do cinamaldeído. Fonte:Santos et al., 2017.....	21
Figura 5- Estrutura química da cumarina.Fonte: Kawatra et al., 2015.....	22
Figura 6 – Espectro de infravermelho do extrato de canela verdadeira.Fonte: Souza,2016.	26
Figura 7- Aspecto visual da canela em casca. A) Canela verdadeira e B) canela falsa.Fonte: Própria autoria.....	35
Figura 8- Espectros das médias das absorbâncias de amostras de canela verdadeira e canela falsa.	38
Figura 9- Gráfico de dispersão para a ACP das amostras de canela verdadeira e falsa: (A) utilizando dados obtidos pelas análises de constituintes bioativos, atividade antioxidante e CLAE-DAD; (B) utilizando dados obtidos por MIR.....	41
Figura 10 - Coeficientes de regressão em função das variáveis dos modelos PLS-DA construídos para classificar amostras de canela como verdadeira ou falsa. A: Modelo calibrado com dados de análises de composição; B: Modelo calibrado com dados do MIR.....	44

LISTA DE ABREVIACOES

ACP – Análise de componentes principais

AD – Análise discriminante

BCAL– Co-oxidao do sistema β - caroteno/ácido linoleico

CFT – Constituintes fenólicos totais

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

CP – Componente principal

FT – Constituintes flavonoides totais

MIR – Espectroscopia no infravermelho médio

PLS-DA – Análise discriminante por mínimos quadrados parciais

LOPES, S. J.; **Aplicação de técnicas espectroscópicas e métodos quimiométricos na diferenciação de canela verdadeira e canela falsa.** Itapetinga BA: UESB, 2020. Dissertação. (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos).

RESUMO

As duas variedades mais comuns de canela encontradas no mercado são a canela verdadeira e canela falsa. A canela verdadeira apresenta maior qualidade em relação a falsa, devido à maior concentração de compostos fenólicos, além de ser mais cara que a canela falsa, que apresenta em sua composição maior teor de cumarina, composto com potencial hepatotóxico. Objetivou-se com o presente estudo a análise comparativa das técnicas MIR e CLAE-DAD para diferenciação de amostras de canela, oriundas de três diferentes países (Brasil, Paraguai e Sri Lanka) utilizando marcadores químicos associada à quimiometria. As amostras de canela em pau foram adquiridas nos estados de São Paulo, Alagoas, Bahia, Rio Grande do Norte, Paraíba, Paraná e Minas Gerais, no Brasil, e em outros países, Sri Lanka e Paraguai, totalizando 129 amostras. As amostras foram diferenciadas em canela verdadeira e falsa através da análise visual. Foram realizadas análises de compostos fenólicos totais e flavonoides totais, taninos condensados, atividade antioxidante DPPH e BCAL, fenólicos individuais por CLAE-DAD e MIR. Os dados obtidos nas análises de compostos bioativos, atividade antioxidante, CLAE-DAD e de MIR foram submetidos às análises multivariadas ACP e PLS-DA. Os resultados revelaram que as amostras de canela verdadeira apresentaram maior concentração de compostos fenólicos e flavonoides totais, atividade antioxidante e menor teor de cumarina quando comparada com a canela falsa. Eugenol, cinamaldeído e cumarina são os marcadores químicos na diferenciação de canela verdadeira e falsa. A ACP mostrou de forma clara a separação de dois grupos de canela permitindo avaliar o comportamento característico das amostras de canela verdadeira e falsa. A PLS-DA foi eficaz na classificação e discriminação das classes das amostras estudadas. Portanto o MIR apresentou uma alternativa mais viável em relação ao CLAE-DAD para a análise e diferenciação rápida e simples de amostras de canela verdadeira e canela falsa.

Palavras-chave: Especiaria, autenticidade, MIR, CLAE, Quimiometria.

LOPES, S. J.; **Application of spectroscopic techniques and chemometric methods to differentiate between true and false cinnamon.** Itapetinga BA: UESB, 2020. Dissertation. (master's in engineering and Food Sciences, Area of Concentration in Food Science).

ABSTRACT

The two most common varieties of cinnamon found on the market are real cinnamon and fake cinnamon. True cinnamon has a higher quality compared to false cinnamon, due to the higher concentration of phenolic compounds, in addition to being more expensive than fake cinnamon, which has in its composition a higher coumarin content, compound with potential hepatotoxic. The objective of this study was to compare the MIR and CLAE-DAD techniques for differentiating cinnamon samples from three different countries (Brazil, Paraguay and Sri Lanka) using chemical markers associated with chemometry. The samples of cinnamon sticks were purchased in the states of São Paulo, Alagoas, Bahia, Rio Grande do Norte, Paraíba, Paraná and Minas Gerais, in Brazil, and in other countries, Sri Lanka and Paraguay, totaling 129 samples. The samples were differentiated into real and false cinnamon through visual analysis. Analyzes of total phenolic compounds and total flavonoids, condensed tannins, antioxidant activity DPPH and BCAL, individual phenolics were performed by HPLC-DAD and MIR. The data obtained in the analysis of bioactive compounds, antioxidant activity, HPLC-DAD and MIR were subjected to multivariate analyzes ACP and PLS-DA. The results revealed that the samples of true cinnamon showed a higher concentration of phenolic compounds and total flavonoids, antioxidant activity and lower coumarin content when compared to false cinnamon. Eugenol, cinnamaldehyde and coumarin are the chemical markers in differentiating true and false cinnamon. The ACP clearly showed the separation of two groups of cinnamon allowing to evaluate the characteristic behavior of samples of true and false cinnamon. PLS-DA was effective in classifying and discriminating the classes of the studied samples. Therefore, MIR presented a more viable alternative in relation to CLAE-DAD for the analysis and quick and simple differentiation of samples of true cinnamon and false cinnamon.

Keywords:Cinnamon,differentiation,composition,MIR,Multivariate

1. INTRODUÇÃO GERAL

A canela (*Cinnamomum sp.*) na forma de casca ou moída é utilizada como ingrediente em diversos produtos alimentícios com o objetivo de fornecer sabor e aroma (PROCOPIO,2018). As variedades de canela Ceilão e Cassia são as duas principais encontradas no mercado, sendo estas diferenciadas como canela verdadeira e canela falsa, respectivamente.

A canela verdadeira é a casca seca das espécies *Cinnamomum verum* e *Cinnamomum zeylanicum*, que apresenta qualidade superior e maior valor comercial em relação a canela falsa por ser mais difícil de ser encontrada e conter maiores quantidades de compostos fenólicos e aromáticos como o eugenol e o cinamaldeído (WANG et al., 2013; KAWATRA et al., 2015). A canela falsa é obtida de espécies como *Cinnamomum cassia*, *Cinnamomum aromaticum*, *Cinnamomum loureiroi* e *Cinnamomum burmannii*. Espécies de canela falsa possuem em sua composição cumarina, composto que pode apresentar efeito hepatotóxico quando consumido em quantidades superiores a 0,1 mg/kg, e podem ser utilizadas como adulterante da canela verdadeira por apresentarem características sensoriais similares (European Food Safety Authority, 2004; YUN et al., 2018).

A canela verdadeira por ser uma especiaria que possui um alto valor agregado e uma maior qualidade quando comparada a canela falsa está altamente vulnerável às fraudes, sendo sua forma moída mais propensa à adulteração (LI et al., 2013; SILVIS et al., 2017).

Alguns métodos têm sido utilizados para a diferenciação da canela verdadeira e falsa. Os mais empregados são a análise visual da canela em forma de pau, análise microscópica (FARAG et al., 2018) e cromatografia (WANG et al., 2009). Essas técnicas apresentam algumas limitações, a avaliação visual é considerada um método subjetivo onde a diferenciação da canela verdadeira e falsa depende da experiência do analista. Além disso, a canela na forma moída limita a diferenciação das variedades tanto na análise visual como na análise microscópica assim como impossibilita a detecção de fraudes por estes métodos. Já a cromatografia costuma apresentar custo elevado, uso de reagentes químicos, solventes e requer o preparo das amostras o que aumenta significativamente o tempo de análise.

A espectroscopia na região do MIR pode ser uma alternativa para a diferenciação de canela verdadeira e canela falsa. O método compreende o estudo da

interação da radiação eletromagnética com a matéria baseando-se nas variações de energia produzidas por transições de moléculas de um estado de energia vibracional para outro (LI et al., 2013). O MIR destaca-se por apresentar rapidez e requerer preparo mínimo da amostra, dispensando o uso de reagentes químicos e evitando a geração de resíduos danosos ao ambiente, além do equipamento ser relativamente fácil de manusear e fornecer diversas informações com apenas um único teste (LOHUMI et al., 2015). A utilização do espectro de infravermelho gera um número grande de variáveis geralmente correlacionadas. Em razão disso, faz-se necessário a utilização de modelos quimiométricos com o objetivo de extrair informações capazes de distinguir amostras como canela verdadeira e falsa.

Nesse sentido, objetivou-se com o presente estudo a análise comparativa das técnicas MIR e CLAE-DAD para diferenciação de amostras de canela, oriundas de três diferentes países (Brasil, Paraguai e Sri Lanka) utilizando marcadores químicos associada à quimiometria.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Canela: aspectos gerais

A canela é uma das especiarias mais conhecidas desde a antiguidade. Seu nome é derivado de uma palavra grega que significa madeira doce. Sendo originada do Sri Lanka, a especiaria é derivada de árvores ou arbustos do gênero *Cinnamomum* e da família *Lauraceae*. A *Cinnamomum* possui cerca de 250 a 350 espécies, distribuídas na América do Norte, América Central, América do Sul, Sudeste Asiático e Austrália. As variedades com espécies de maior importância são a canela verdadeira (*Cinnamomum zeylanicum* (Figura 1) e *Cinnamomum verum*), e canela falsa (*Cinnamomum cassia*, *Cinnamomum aromaticum*, *Cinnamomum burmannii* e *Cinnamomum loureiroi*) (NABAVI et al., 2015).



Figura 1- Canela verdadeira (*Cinnamomum zeylanicum*). Fonte: Duarte, 2014.

Segundo dados da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (Tabela 1), os maiores produtores mundiais de canela em 2018 foram a Indonésia, a China, o Vietnã e a Sri Lanka (FAO, 2020). No Brasil, a canela foi introduzida pelos jesuítas e espécies como a *Cinnamomum zeylanicum* e *Cinnamomum aromaticum*, por exemplo, são cultivadas desde o sul da Bahia até o Rio Grande do Sul, sendo consumidas cada vez mais na sua forma de pó devido à praticidade que ela oferece (SALOMÃO, 2014).

Tabela 1 – Produção mundial de canela no ano de 2018.

País	Produção (toneladas)
Indonésia	83.734
China	81.545
Vietnam	29.053
Sri Lanka	24.020

Fonte: FAO- *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (2020).

Atualmente, especiarias como a canela estão atraindo muito interesse, tanto pela indústria quanto pelos consumidores. A canela tem sido utilizada em preparações de condimentos, na indústria farmacêutica, de cosméticos e para fins medicinais. Todas as partes da planta podem ser aproveitadas, podendo ser adicionada ao alimento na sua forma de material integral ou moída, a chamada canela em pó. O óleo volátil vem das diferentes partes da planta e possui a mesma matriz de hidrocarbonetos em proporções variáveis com os principais constituintes, o cinamaldeído (casca), o eugenol (folha) e a cânfora (raiz). De acordo com as variações na composição química da planta, a canela possui uma vasta gama de atividades biológicas e potenciais aplicações, apresentando também muitos benefícios para a saúde. Possuem propriedades anti-inflamatórias, efeito antitumoral, efeito inseticida, atividade antidiabética e atua na prevenção de problemas neurológicos (SANTOS et al., 2017).

A canela pode ser utilizada como aditivo natural pela indústria de alimentos, apresenta atividade antibacteriana atuando na inibição do desenvolvimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes, possui ação antioxidante e antifúngica. A sua aplicação também pode ser direcionada para a produção de embalagens ativas, evitando a necessidade da adição de conservantes químicos nos alimentos, o que interfere na decisão de compra do consumidor que tem preferência por algo que é considerado como seguro (NABAVI et al., 2015; SANTOS et al., 2017).

2.2 Canela verdadeira e Canela falsa

A canela verdadeira (*C. verum* e *C. zeylanicum*) conhecida como Laurus Canela ou Canela do Ceilão, possui a casca de composição simples ou dupla, enquanto a Canela Chinesa, a Cássia Chinesa, a Canela Bastarda, a Cássia ou a canela falsa possuem uma única camada de casca cortiçada, sendo possível diferenciá-las por meio da análise microscópica (Figura 2). A canela verdadeira é uma especiaria altamente valorizada e considerada superior quando comparada a canela falsa, que é mais

comumente encontrada e mais barata. Esse baixo custo da canela falsa pode ser justificado pelo fato dela possuir aroma mais fraco e sabor mais adstringente causado pela presença de taninos condensados encontrados no tecido da cortiça, além de possuir em sua composição maior conteúdo de cumarina, composto que pode acarretar malefícios a saúde ainda pouco conhecidos, como insuficiência hepática, quando consumido em excesso (mais de 0,1 mg / kg de peso corporal) (*European Food Safety Authority*, 2004; FARAG et al., 2018).

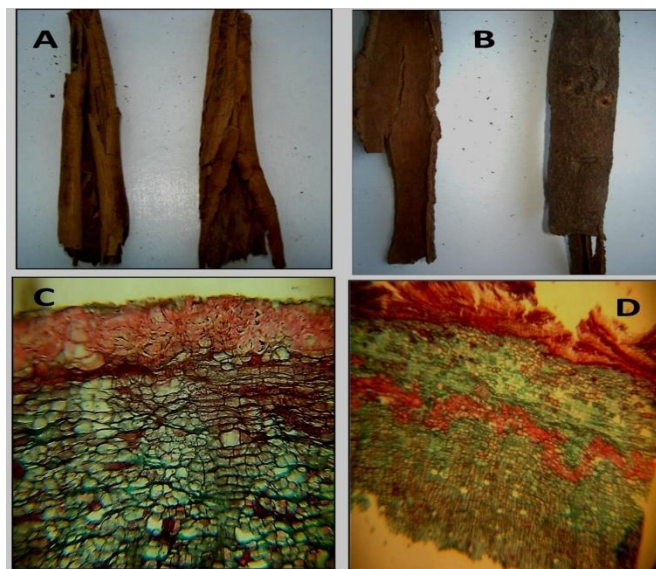


Figura 2- Morfologia da canela verdadeira (Ae C) e canela falsa (B e D). Fonte: Farag et al., 2018.

As principais diferenças entre os tipos de canela encontram-se apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2- Principais diferenças entre os tipos de canela.

	<i>C.zeylanicum*</i>	<i>C. burmanni</i>	<i>C.loureiroi</i>	<i>C. aromaticum</i>
País de origem	Sri Lanka	Indonésia	Vietnam	China
Gosto	Ligeiramente doce	Picante	Picante/doce	Picante/amarga
Cor	Marrom claro	Marrom avermelhado	Marrom avermelhado	Marrom avermelhado
Características especiais	Baixo teor de cumarina	Alto teor de cumarina	Alto teor de cumarina	Alto teor de cumarina

Canela verdadeira*

Fonte: Kawatra et al., 2015.

Espécies de canela verdadeira diferem de canela falsa tanto visualmente quanto em aspectos sensoriais e composição química (Tabela 2). Visualmente a canela verdadeira em casca se apresenta em formas de cilindros enrolados igualmente a canela falsa. Entretanto, apresentam cor marrom clara enrolada em várias camadas enquanto a canela falsa é castanho-avermelhada e enrolada em apenas em uma camada (KAWATRA et al., 2015). Possuem menor espessura, sendo mais quebradiça que a canela falsa. A Canela verdadeira é conhecida por possuir um sabor mais adocicado quando comparada às espécies de canela falsa, entretanto segundo Farag et al, (2018) em um estudo utilizando espectroscopia RMN não observaram sinais importantes de açúcares e esse sabor adocicado pode ser atribuído ao conteúdo de glicerol presente na composição da canela verdadeira. Dessa maneira a combinação glicerol e cinamaldeído aumentam a palatabilidade da canela uma vez que, o glicerol é um álcool de açúcar como o sorbitol possuindo um sabor doce porém sendo menos digerível.

A variação no conteúdo de macro e micro nutrientes da canela pode ser atribuída às diferenças das espécies, variedades, condições de crescimento, épocas de colheita, propriedades do solo, clima, origem, condições ambientais e parâmetros geográficos. A canela, assim como algumas plantas aromáticas, fornecem proteínas, fibras, componentes voláteis, vitaminas (A,B e C), minerais (Ca, P, Na, K e Fe) e compostos químicos conhecidos por prevenir e promover melhorias na saúde (SANTOS et al., 2017). A Tabela 3 apresenta a composição nutricional entre as variedades canela verdadeira e canela falsa.

Tabela 3- Composição nutricional de duas espécies de canela.

Componente (g/100g)	Canela verdadeira	Canela falsa
Água	9,45	7,7
Cinza	3,77	2,89
Proteína total	4,99	4,1
Lipídeo	4,69	4,65
Fibra	21,27	33,41
Carboidrato	55,83	47,25

Fonte: Santos et al.,2017.

2.2.1 Composição fenólica das variedades de canela

Fatores como as diferenças das espécies e origem geográfica têm influência na variabilidade do perfil de composição e quantidade de componentes individuais. O cultivo da canela em condições ambientais distintas pode afetar a composição da planta de tal maneira que uma mesma espécie ou variedade que é cultivada em outro país, pode diferir daquela que é obtida diretamente do seu país de origem com consequente variação em relação a concentração de seus principais componentes (LI et al., 2013).

O conteúdo fito químico das plantas aromáticas depende também da época de colheita, sendo a maior concentração de compostos obtida em ramos com dois anos de idade, além de que o conteúdo de fito químico não é homogeneizado nas diferentes partes da planta sendo sua quantidade influenciada pelo método de secagem utilizado (LI et al., 2013). Em um estudo realizado por Bernard et al., (2014) entre os métodos de secagem (secagem ao sol, secagem à sombra, secagem ao forno e liofilização) apenas amostras secadas ao sol tiveram seu conteúdo de fenólicos e flavonoide total degradado quando comparadas às amostras frescas. Tal acontecimento pode ser atribuído pela degradação enzimática dos fito químicos pela exposição prolongada ao sol.

Na canela são encontrados compostos fenólicos divididos em categorias distintas, como os fenóis simples, os ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzoicos e cinâmico), as cumarinas, os flavonoides e os taninos. A canela contém principalmente ácido vanílico, cafeico, gálico, protocatecólico, *p*-oceânico e ferúlico. Os componentes voláteis irão depender da parte da planta sendo o cinamaldeído o principal. Os outros compostos voláteis menores são hidrocarbonetos e compostos oxigenados (β -cariofileno, benzoato de benzila, linalol, acetato de eugenila e acetato de cinamila) (NABAVI et al., 2015). Os principais compostos fenólicos das variedades de canela são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4- Principais compostos fenólicos das variedades de canela detectados por cromatografia.

Compostos(mg/g) de peso seco	Canela verdadeira	Canela falsa
Ácido salicílico	0,00287	0,00328
Ácido cafeico	0,24	0,15
Ácido clorogênico	0,00019	0,00946

Ácido ferúlico	0,00091	0,00342
Catequina	4,54	10,57
Epicatequina	0,0072	0
Quercetina	0,07	0
Cumarina	4,72	18,7
Eugenol	13,2	0
Cinamaldeído	99,3	54,4
Rutina	0,009	0,006

Fonte: Wang et al., 2013; Santos et al., 2017; Farag et al., 2018

Espécies de canela verdadeira como *C.zeylanicum* podem apresentar maior atividade sequestradora de radicais DPPH • (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) em seu caule, de onde é originada a forma moída da canela. Esses resultados estão associados a maiores concentrações e maior estabilidade dos compostos ativos (Bernard et al., 2014).

A canela representa uma das fontes alimentícias mais ricas de taninos possuindo em média teores de taninos condensados totais em torno de 8,1g/100g que apesar de estarem presentes em maiores quantidades em espécies de canela falsa também podem ser encontrados na canela verdadeira. Taninos condensados, também chamados proantocianinas, são um grupo de moléculas formadas por duas ou mais unidades de flavan-3-ols, destacando-se catequina e epicatequina. Os taninos condensados apresentam gosto amargo e causam sensação de adstringência que ocorre devido a sua capacidade de se ligar e precipitar proteínas da saliva. Entretanto estudos revelam que os taninos condensados presentes em diferentes espécies de canela, são os principais responsáveis por estimular o metabolismo da glicose, a síntese de glicogênio e liberação de insulina *in vitro* (ANDERSON, 2004; SOUZA, 2016; FARAG et al., 2018) .

2.2.2 Principais compostos indicadores químicos das variedades de canela

Os principais marcadores químicos capazes de diferenciar a canela verdadeira das variedades de canela falsa são o eugenol, o cinamaldeído e a cumarina (SANTOS et al., 2017; FARAG et al., 2018).

O eugenol é uma substância fenólica aromática de odor e sabor agradáveis, pertencente à classe alil-benzeno dos fenilpropanóides (Figura 3). É geralmente encontrado na forma de um líquido oleoso amarelado presente em uma variedade de plantas incluindo plantas do gênero *Cinnamomum*. Apresenta atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral interferindo na fisiologia dos microrganismos e quando em combinação com outros compostos como o cinamaldeído possui um efeito sinérgico

contra vários patógenos (MARCHESE et al., 2017). O composto eugenol é o principal indicador de espécies de canela verdadeira, podendo muitas vezes estar totalmente ausente em espécies de canela falsa. Utilizando as técnicas de espectroscopia por ressonância magnética nuclear e ACP Farag et al., (2018) conseguiram diferenciar canela verdadeira de canela falsa com base na presença ou ausência de eugenol.

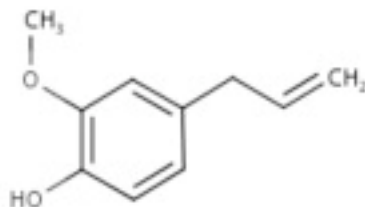


Figura 3- Estrutura química do eugenol. Fonte: Santos et al., 2017.

O cinamaldeído (Figura 4) é um composto fenólico com propriedades antimicrobianas e anti- inflamatórias além de aumentar os níveis de insulina no sangue exercendo uma atividade antidiabética. Apresenta-se como um líquido amarelo e oleoso é o principal composto que confere aroma amadeirado a canela (PONCIANO et al., 2020). Pode estar presente nas duas variedades de canela, porém maiores concentrações do composto são geralmente encontradas em espécies de canela verdadeira (FARAG et al.,2018). Otrans-cinamaldeido foi identificado como um dos principais compostos presentes em óleo essencial de diferentes espécies de canelas, incluindo *C. verum*, *C. cassia* e *C. loureirii* , no entanto a menor concentração é encontrada na canela falsa (*C. Cassia*), sendo este um componente marcante na diferenciação entre canela verdadeira e canela falsa (LI et al., 2013).



Figura 4- Estrutura química do cinamaldeído. Fonte:Santos et al., 2017.

A cumarina se destaca por estar presente em grandes quantidades em espécies de canela falsa (6,4%), enquanto espécies de canela verdadeira apresentam apenas traços (0,1%) ou total ausência desse composto (NABAVI et al., 2015; SANTOS et al., 2017). É formada por um anel aromático fundido a um anel lactona condensado (Figura

5) e é um composto com poder cancerígeno capaz de causar hepatotoxicidade por meio do consumo excessivo, quando presente em alimentos que utilizam como ingrediente a canela falsa, tais como biscoitos e cereais (KAWATRA et al., 2015). De acordo com BRASIL (2007), a cumarina não deve ser adicionada aos flavorizantes, tendo concentração máxima permitida em alimentos e bebidas de 2 mg/kg com exceções para determinados tipos de doces com caramelo e em bebidas alcoólicas cujo limite é de 10 mg/kg.

Em 2004, a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA) calculou a dose diária tolerada (TDI) para cumarina baseada nos estudos toxicológicos feitos em animais. A TDI foi também calculada pelo Instituto Federal Alemão para a Avaliação do Risco (BfR) com base nos relatos de estudos toxicológicos realizados em animais, mas também, com base nos estudos toxicológicos realizados em humanos. Ambos os cálculos resultaram na TDI de 0,1 mg de cumarina por kg de peso corporal por dia (*European Food Safety Authority*, 2004; Mielke et al., 2011).

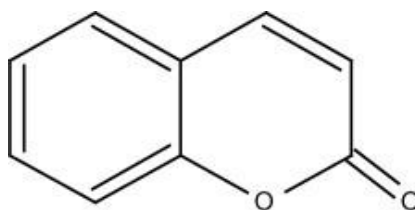


Figura 5– Estrutura química da cumarina. Fonte: Kawatra et al., 2015.

YUN et al., (2018) avaliaram o efeito toxicológico do consumo do extrato de canela falsa (*C. cassia*) em ratos e observaram que uma dose de 2000 mg/kg de extrato de canela falsa promoveu indução do aumento de peso do rim e do fígado de ratos de ambos os sexos, fato que foi atribuído ao alto teor de cumarina presente no extrato da canela consumida durante o experimento (6,4 mg/kg).

Ainda não estão totalmente claros os efeitos toxicológicos que a cumarina pode causar em seres humanos mas pessoas que consomem canela com alto teor de cumarina podem causar danos ao fígado. É difícil para os consumidores estimar adequadamente o conteúdo de cumarina em alimentos contendo canela, uma vez que a rotulagem atual não exige a listagem do tipo de canela usada, verdadeira ou falsa. Entretanto, é importante o respeito da dose máxima diária recomendada (0,1 mg / kg de peso corporal) devendo se considerar abandonar o uso de produtos contendo cumarina

para bebês e crianças pequenas (*European Food Safety Authority*, 2004; KRUGER et al., 2018).

WANG et al. (2009) identificaram compostos voláteis no óleo essencial das folhas de cinco diferentes espécies de canela sendo elas *Cinnamomum cassia*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Cinnamomum tamala*, *Cinnamomum burmanni* e *Cinnamomum pauciflorum*. Os autores observaram que na canela falsa (*C. cassia*) não houve a identificação do composto eugenol, sendo que o mesmo detectado nas demais espécies. Entretanto a canela falsa apresentou alto teor de cumarina, também encontrado em concentração ainda maior na *C. burmanni* (a chamada cassia da Indonésia), não sendo identificado nas espécies *zeylanicum*, *tamala* e *pauciflorum*.

2.3 Fraude Alimentar em especiarias

Pode-se dizer que fraude alimentar é a expressão usada para uma substituição intencional, adição, adulteração de alimentos, ingredientes alimentícios ou embalagens de alimentos, declarações falsas ou enganosas feitas sobre um produto economicamente motivado com fins lucrativos. Apesar de a motivação ser econômica, a fraude alimentar muitas vezes ocasiona danos à saúde do consumidor, uma vez que os adulterantes podem não ser convencionais e os controles oficiais poderão não estar aptos a informarem esse tipo de contaminante e seus respectivos danos causados a saúde nem sempre são conhecidos (SPINK et al., 2011).

As fraudes em alimentos podem ser classificadas em quatro grupos, sendo eles:

- Fraudes por alteração
- Fraudes por adulteração
- Fraudes por falsificação
- Fraudes por sofisticação

As fraudes por alteração são modificações que afetam as características do produto, envolvendo suas qualidades físicas, químicas e a capacidade nutritiva. Considerada fraude se o vendedor estiver ciente do risco que o produto causa para a saúde e mesmo assim executar a venda do produto (REISSIG, 2009).

Fraudes por adulteração ou substituição são aquelas feitas intencionalmente e afetam características sensoriais e nutricionais do produto. Dentre elas está a substituição de um ingrediente ou matéria prima de maior valor por outro de menor valor, visando ganhos econômicos (SPINK et al., 2015). Esta fraude corriqueiramente ocorre na substituição de canela verdadeira por canela falsa.

Fraudes por falsificação ocorrem quando o consumidor é induzido à compra de um produto inferior achando estar levando o produto original e superior, pagando o preço do último. Fraudes por sofisticação são parecidas com as fraudes por falsificação onde o consumidor não percebe estar comprando um produto inferior se passando por um produto sofisticado. Ocorre muito na venda de bebidas onde os rótulos de garrafas são reaproveitados (REISSIG, 2009).

As fraudes alimentares podem ocasionar três tipos de riscos, sendo uma ameaça para a saúde do consumidor. O risco direto que é quando o consumidor é colocado em risco imediato, com exposição em curto prazo podendo ocasionar uma elevada toxicidade ou mesmo até a morte. O risco indireto é quando o consumidor é colocado em risco por uma exposição em longo prazo a baixas doses de contaminantes e compostos tóxicos com potenciais efeitos crônicos, e o risco técnico que é de natureza não material, quando a documentação não é representativa do conteúdo alimentar (SPINK et al., 2011).

O consumo de especiarias trituradas e moídas aumentou nos últimos anos devido à praticidade que elas trazem para o consumidor na hora do preparo das refeições. O processamento de especiarias moídas ou trituradas permite que países em desenvolvimento agreguem valor aos seus produtos. Porém, há uma preocupação na compra de ervas e especiarias, pois devido à sua forma de processamento e sua forma final, onde há um maior risco de adulteração e fraudes. As cadeias de produção de especiarias são longas e complexas e podem passar por diversos países, por esse motivo apresentam muitas oportunidades para que sejam feitas adulterações economicamente motivadas (GALVIN-KING et al., 2018).

A canela verdadeira por ser uma especiaria que possui um alto valor agregado e uma maior qualidade quando comparada a canela falsa está altamente vulnerável às fraudes, sendo sua forma moída mais propensa à adulteração, pois sua moagem altera a forma do adulterante para pó, dificultando a sua detecção no produto final (LI et al., 2013; SILVIS et al., 2017). As fraudes em especiarias como a canela, podem gerar muitos riscos possíveis para a saúde, uma vez que, compostos tóxicos como a cumarina podem ser encontrados em grande quantidade quando ocorre a substituição de canela verdadeira por canela falsa (GALVIN-KING et al., 2018).

A alta qualidade da canela está relacionada a maior presença de compostos que tornam possíveis suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatória, efeito

antitumoral, efeito inseticida, atividade antidiabética e antibacteriana. Para a identificação de canela de alta qualidade e assim combater fraudes alimentares, identificando contaminantes e adulterantes, há uma necessidade de equipamentos e métodos rápidos e precisos, como a espectroscopia de infravermelho (LI et al., 2013; SPINK et al., 2015; FARAG et al., 2018).

2.4 Espectroscopia por Infravermelho

Para que seja possível diferenciar as variedades de canela em verdadeira ou falsa são desejáveis métodos rápidos, práticos e precisos. Nesse sentido, a espectroscopia no infravermelho atende de maneira satisfatória estes requisitos. Uma das grandes vantagens da espectroscopia por infravermelho é a possibilidade de estudar qualquer estado físico, permitindo análises rápidas, limpas e sem necessidade de reagentes agressivos e tratamento da amostra (FONTES et al., 2020).

A espectroscopia consiste na ciência que trata e compreende as interações dos diversos tipos de radiação eletromagnética com a matéria, de modo que o principal objetivo é a determinação dos níveis de energia e transições de espécies atômicas e moleculares. Dessa maneira, os métodos utilizando espectros de absorção no infravermelho de espécies moleculares baseiam-se nas variações de energia produzidas por transições de moléculas de um estado de energia vibracional para outro (SKOONG et al., 2009; LI et al., 2013)..

A região do infravermelho (IR, do inglês *infrared*) do espectro eletromagnético, compreende a radiação com número de onda que varia de cerca de 12.800 a 10 cm^{-1} , ou com comprimento de onda de 0,78 a 1.000 μm , podendo ser dividida em três partes principais: infravermelho próximo (NIR – Near Infrared - região das harmônicas) 0,78 – 2,5 μm (12.800 – 4.000 cm^{-1}); infravermelho médio (MIR – Middle Infrared - região de vibração-rotação) 2,5 – 50 μm (4.000 – 200 cm^{-1}) e infravermelho distante (FIR – Far Infrared - região de rotação) 50 – 1.000 μm (200 – 10 cm^{-1}) (SKOONG et al., 2009).

O MIR destaca-se por ser uma técnica analítica moderna de larga aplicação em diversas áreas da pesquisa científica, apresentar rapidez e requerer simplicidade no preparo da amostra analisada. Consiste em analisar a amostra na região do infravermelho médio do espectro eletromagnético, gerando dados através de bandas que representam informações sobre as vibrações das moléculas presentes na amostra. Tais vibrações moleculares ocorrem quando a radiação infravermelha é absorvida por um

grupo funcional. A depender da quantidade de absorção e do tipo de ligação, serão formados picos variando de largos a estreitos, altos ou baixos, no amplo comprimento de onda da região infravermelha. Esta técnica produz gráficos com os dados espectrais obtidos e é eficaz para avaliar adulterações em diversos produtos alimentícios (GALVIN-KING et al., 2018).

MIR é um método eficaz da identificação de compostos da canela. Este possibilita à identificação de forma abrangente e precisa de componentes que se tornam essenciais na avaliação da qualidade da canela. Apesar da ocorrência de sobreposição de alguns componentes devido a sua complexidade, a faixa entre 600 a 1800cm^{-1} é a mais apta à identificação, sendo altamente informativa (LI et al., 2013; JEYARATNAM et al., 2016; BEHBAHANI et al., 2020).

Souza (2016) avaliou o extrato de canela verdadeira no MIR (Figura 6) e segundo o autor a banda 3330 cm^{-1} que é característica dos grupos hidroxílicos (OH) podem pertencer a compostos fenólicos e carboidratos e os picos que aparecem por volta de 1282 , 1251 e 1207cm^{-1} são devidos a presença de taninos de flavonoides.

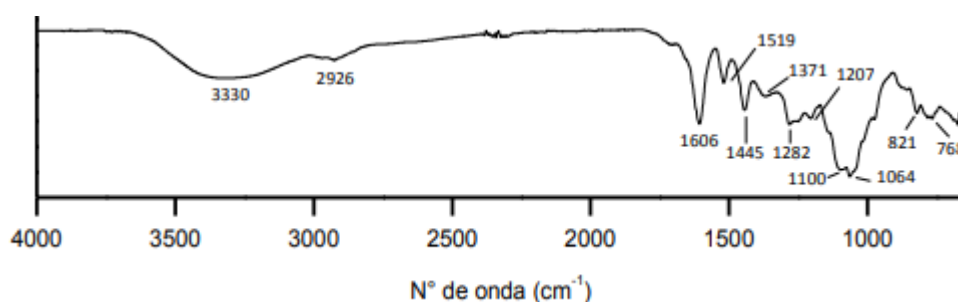


Figura 6 – Espectro de infravermelho do extrato de canela verdadeira. Fonte: Souza, 2016.

2.5 Quimiometria

Devido a espectroscopia originar uma grande quantidade de dados é comum esses métodos serem associados às análises quimiométricas onde ela está relacionada a técnicas estatísticas que realizam análises de várias medidas simultaneamente dos indivíduos ou objetos sob investigação. Dessa forma, é considerada como multivariada qualquer análise que, de forma simultânea, trata mais do que duas variáveis de um planejamento experimental. A análise multivariada consiste no tratamento matemático de dados resultantes de outras análises, como a espectroscopia, com intuito de realizar uma análise exploratória, calibração e classificação dos dados, bem como otimização de

experimentos. Algumas técnicas multivariadas podem ser citadas, como por exemplo a ACP e PLS-DA (MINGOTI, 2005).

A ACP é uma técnica não supervisionada e exploratória, onde o principal objetivo é simplificar estruturas de um grande conjunto de dados, reduzindo a combinações lineares possivelmente significativas. Tem sido utilizada como uma análise inicial para a análise multivariada de dados é rápida e fornece uma visão geral das informações mais importantes, as quais se tornam mais visíveis e fáceis de serem analisadas e compreendidas. A ACP encontra relações entre as variáveis tornando possível um agrupamento e detecção de variáveis que não contribuem para o entendimento geral dos dados, o que possibilita utilização de um menor número de variáveis sem perdas significativas de informação presente no conjunto total de dados (PACHECO et al., 2013).

A PLS-DA é baseada em um método convencional de regressão PLS, em que a matriz $(I \times J)$ X é uma matriz preditora e a matriz de resposta $(I \times K)$ Y compreende variáveis categóricas (fictícias) que descrevem a participação na classe. K é igual ao número de classes. Se apenas duas classes forem consideradas, a matriz Y será reduzida para um vetor $(I \times 1)$ y. Quando a regressão PLS é desenvolvida, o valor de resposta Y_{pred} é previsto para uma nova amostra. A decisão é baseada na comparação de Y_{pred} com determinadas variáveis categóricas em Y. A amostra é atribuída à classe, que tem uma distância mínima entre Y e Y_{pred} (RODIONOVA et al., 2016).

Chen et al., (2014) realizaram a diferenciação das quatro espécies principais de canela (*C. Burmanni*, *C.verum*, *C. Cassia* e *C.loureiroi*) usando um método de impressão digital por espectrometria de massa por injeção de fluxo (FIMS) aliado a ACP.

Farag et al., (2018) utilizaram a ACP e a PLS-DA para separar e analisar a variação das impressões digitais da Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de canela verdadeira (*C.verum*) e canela falsa(*C.cassia*) de maneira não segmentada. A ACP é um método de *clustering* não supervisionado que diminuiu a dimensionalidade dos dados multivariados.

3. OBJETIVOS GERAIS

3.1 Objetivo Geral

Análise comparativa das técnicas MIR e CLAE-DAD para diferenciação de amostras de canela, oriundas de três diferentes países (Brasil, Paraguai e Sri Lanka) utilizando marcadores químicos associada à quimiometria.

3.2 Objetivos Específicos

- Realizar a análise visual, como forma de triagem, para a diferenciação da canela em verdadeira e falsa;
- Determinar o potencial dos constituintes bioativos das amostras de canela pela quantificação de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, taninos condensados;
- Determinar a atividade antioxidante DPPH e BCAL;
- Quantificar os compostos fenólicos individuais das amostras de canela por meio de CLAE-DAD para identificar os principais marcadores químicos na diferenciação da canela verdadeira e falsa;
- Interpretar dados dos grupos funcionais de compostos utilizados na diferenciação da canela através de espectros de amostras de canela verdadeira e falsa utilizando o MIR;
- Utilizar os dados coletados nas análises (constituintes bioativos, atividade antioxidante, CLAE-DAD e MIR) e aplicar a quimiometria para a diferenciação de amostras de canela;
- Comparar o método de CLAE-DAD com o MIR em relação ao desempenho e viabilidade para a diferenciação de amostras de canela verdadeira e falsa.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta, diferenciação e preparo das amostras

As amostras de canela em pau foram adquiridas de três diferentes países (Brasil, Paraguai e Sri Lanka) no período de 2019 e 2020. As amostras coletadas no Brasil foram procedentes de São Paulo (24 amostras), Alagoas (20 amostras), Bahia (27 amostras), Rio Grande do Norte (17 amostras), Paraíba (12 amostras), Paraná (4 amostras) e Minas Gerais (21 amostras); enquanto as do Sri Lanka (1 amostra) e do Paraguai (3 amostras), totalizando 129 amostras.

Para a diferenciação e separação entre canela verdadeira e falsa foi utilizada como forma de triagem a análise visual (KAWATRA et al., 2015) baseada nos parâmetros de coloração e textura da casca da canela de maneira que as canelas que apresentaram coloração marrom clara, casca quebradiça e enrolada em várias camadas foram previamente classificadas como canela verdadeira e as canelas que apresentaram coloração marrom avermelhado e casca grossa enrolada em apenas uma camada foram classificadas como canela falsa.

Após a classificação todas as amostras foram moídas em um moinho de bola (MA 350, MARCONI) por aproximadamente 3 minutos. O tamanho de partículas das amostras foi padronizado pela classificação em peneiras (300 x 75mm, Solotest).

4.2 Preparo do extrato para as análises espectrofotométricas

Inicialmente foram pesados 0,2 g de cada amostra moída e adicionados 10 mL de metanol (FARAG et al., 2018), sendo agitados em vórtex (Cslvortex, Cleaver Scientific Ltd) por 1 minuto. Na sequência, os tubos foram centrifugados (SP Labor, Sp-701, Presidente Prudente, Brasil) a 5000 g durante 15 minutos. Os sobrenadantes resultantes da centrifugação foram utilizados como extrato nas análises subsequentes.

4.3 Compostos Fenólicos Totais - CFT

O conteúdo fenólico total foi determinado usando o reagente de Folin Ciocalteu (SINGLETON et al., 1998). Os extratos das amostras foram diluídos na faixa de 1 para 10 e uma alíquota de 0,5 mL foi transferida para tubos de ensaio, adicionando-se 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu 10%. A mistura permaneceu em repouso por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 2 mL de carbonato de sódio 7,5%. Após a incubação por 2 horas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a absorbância foi medida em espectrofotômetro (Marca Shimadzu Modelo UV Mini 1240) a 720 nm. Uma amostra

em branco foi conduzida nas mesmas condições e os resultados dos compostos fenólicos totais foram expressos como equivalentes em ácido gálico (EAG) (mg EAG / g de amostra.), através de uma curva de calibração preparada com soluções de concentrações conhecidas do padrão de ácido gálico (0,01 a 0,1 mg ácido gálico.ml⁻¹ de solução) .

4.4 Flavonoides Totais - FT

Os compostos flavonoides totais foram quantificados por espectrofotometria UV/Vis de acordo com o método descrito por Sakanaka et al., (2005), utilizando cloreto de alumínio. A análise foi realizada adicionando-se em tubos de ensaio, 0,5 ml do extrato da canela diluído 1 para 5, 2,5 mL de água destilada e 0,15 mL de nitrito de sódio a 5%. Essa mistura foi homogeneizada por agitação em vórtex e mantida em repouso por 6 minutos a abrigo de luz. Em seguida, foi adicionado 0,3 mL de uma solução metanólica de cloreto de alumínio 10%, a mistura foi novamente agitada e mantida em repouso e abrigo de luz por 5 minutos. Logo depois adicionou-se 1 mL de hidróxido de sódio 1M e 0,55 mL de água destilada afim de se obter um volume final de 5 mL. A leitura de absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Shimadzu Modelo UV Mini 1240) a 510 nm, para o branco utilizou-se etanol absoluto no lugar da amostra. O teor de flavonoides totais foi expressa como equivalente de catequina (mg de eq. Catequina. g de amostra⁻¹), através de uma curva de calibração preparada com soluções de concentrações conhecidas do padrão de catequina (0,02 a 0,51 mg catequina.ml⁻¹ de solução) nas mesmas condições.

4.5 Determinação de taninos condensados

A determinação de taninos condensados por meio do método vanilina seguiu a metodologia proposta por Tiitto-Julkunem (1985) de maneira que a reação se dá por meio de um aldeído aromático (neste caso a vanilina) com um anel metal-substituído dos flavonóis, gerando um composto de cor vermelha. Os resultados foram expressos em mg de catequina por g de amostra em base seca através de uma curva de calibração do padrão de catequina (Sigma Aldrich) nas concentrações de 0 a 1,25 mg.mL⁻¹ de solução.

4.6 Determinação da atividade antioxidante *in vitro* (2,2-Difenil-1-picrilhidrazil-DPPH)

A atividade antioxidante *in vitro* da canela foi avaliada utilizando o 2,2-difenil-1-picrilhidrazilil (também conhecida como capacidade de sequestrar o radical DPPH) (MOLYNEUX, 2004). A quantidade de 0,1 mL do extrato diluído 1 para 2 foi transferida para tubos de ensaio com 3,9 mL da solução etanoica (Etanol - álcool absoluto 99,8%) do radical DPPH (0,004%). Após 30 minutos de incubação no escuro e à temperatura ambiente, a redução do radical livre DPPH foi medida através da leitura da absorbância em espectrofotômetro (Marca Shimadzu Modelo UV Mini 1240) 515nm. O mesmo procedimento foi realizado com etanol em substituição a amostra, considerado branco. A atividade antioxidante foi expressa em percentual de inibição.

4.7 Determinação da atividade pelo método da co-oxidação do sistema β -caroteno:ácido linoleico – BCAL

O método de análise antioxidante pelo sistema β -caroteno:ácido linoleico utilizado foi descrito por Miller (1971). Para o preparo da mistura reativa, adicionou-se 50 μ g de ácido linoleico, 200 mg de Tween 40, 1 mL de solução de β -caroteno a 1 mg.mL⁻¹ em clorofórmio. Posteriormente, a mistura foi submetida ao evaporador rotativo a 50°C por 10 minutos para a completa evaporação do clorofórmio. A esta mistura isenta de clorofórmio, adicionou-se aos poucos 50 mL de água previamente saturada com oxigênio durante 30 minutos agitando-se vigorosamente. A mistura reativa, assim preparada, apresentou absorbância entre 0,6 e 0,7 em 470 nm. Outra mistura reativa foi preparada de forma semelhante com exceção da adição da solução de β -caroteno para o branco.

Alíquotas de 5 mL da emulsão foram transferidos para tubos contendo 0,5 mL dos extratos diluídos a 10 mg.mL⁻¹ em metanol, realizados em triplicata. Feita a mistura os tubos foram agitados e imediatamente lidos as absorbâncias a 470 nm. Após a primeira leitura, os tubos foram incubados em banho-maria a 50 °C, e em intervalos de quinze minutos até completar 120 minutos, a leitura a 470 nm, foi repetida. Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição da oxidação. A redução da absorbância do sistema sem amostra (Equação 1) é considerada como 100% da oxidação.

$$\text{Redução da absorbância} = \text{Abs inicial} - \text{Abs final} \text{ Equação 1}$$

O decréscimo da leitura da absorvância das amostras é correlacionado com o sistema e estabelece o percentual de oxidação (Equação 2), subtraindo-se o percentual de oxidação de cada amostra de 100 (Equação 3).

$$\% \text{ Oxidação} = \frac{[(\text{Redução Abs})_{\text{amostra}} \times 100]}{(\text{Redução Abs})_{\text{sistema}}} \quad \text{Equação 2}$$

$$\% \text{ Proteção} = 100 - (\% \text{ Oxidação}) \quad \text{Equação 3}$$

4.8 Quantificação de compostos fenólicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD)

O extrato utilizado para análise cromatográfica foi preparado a partir de uma dispersão 1% (m/v) de canela em pó em uma solução de 50% (v/v) de metanol em água ultrapura. Essa dispersão foi submetida a extração ultra-sônica (Sanders medical, SoniClean 6, Brasil) em temperatura ambiente por 30 minutos e filtrada com membranas de 0,2 μm (Syringe Filter, PVDF030N022I, Taiwan). As análises foram realizadas em sistema de cromatografia líquida (Shimadzu®, Tokyou, Japão), incluindo duas bombas, injetor, detector UV-Vis e controlador de sistema. A separação cromatográfica baseou-se na metodologia proposta por Ding et al. (2011) com modificações.

A separação cromatográfica dos compostos fenólicos foi realizada em uma coluna de fase reversa C18 (5 μm , de 25cm \times 4,6mm) (SupelcoAnalytical, Sigma Aldrich). O volume de injeção utilizado foi de 20 μL . A fase móvel consistiu no gradiente de de ácido fosfórico aquoso 0,1% (solvente A) e acetonitrila (solvente B), com fluxo constante de 1 mL.min⁻¹. A corrida iniciou-se com 10% do solvente B variando até 20% em 12 minutos, aumentando para 50% de B em 35 minutos, 75% de B em 45 minutos, 100% de B em 50 minutos e retomando para 10% de B em 60 minutos. O tempo de corrida total foi de 65 minutos. A identificação dos compostos foi realizada com base na comparação do tempo de retenção e na comparação entre os espectros UV/Vis dos padrões com os analitos presentes nas amostras. A quantificação dos analitos foi realizada por meio de curva de calibração dos padrões, obtidas em diferentes concentrações (0 a 1mg/mL), utilizando as áreas dos analitos no cromatograma.

Os padrões foram escolhidos de acordo com a composição da canela citada em literatura (WANG et al., 2013; SANTOS et al., 2017; FARAG et al., 2018; BEHBAHANI et al., 2020). Foram utilizados padrões (Sigma Aldrich) de ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido clorogênico, ácido gálico, ácido cumárico, catequina, epicatequina, quercetina, rutina, cinamaldeído, eugenol e cumarina, diluídos em metanol em concentrações variando de 0 a 1 mg/mL, para identificação e quantificação dos analitos presentes nas amostras.

4.9 Espectroscopia de Infravermelho Médio -MIR

A análise espectroscópica por MIR foi realizada nas amostras de canela. Os espectros foram obtidos por meio da Espectroscopia de Infravermelho Médio com Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada do FTIR-ATR(Cary 630 FTIR, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA), utilizando-se a faixa espectral de 4000 a 500 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} , 64 scans e leitura por meio do cristal de diamante. Durante a coleta, a temperatura no laboratório foi mantida em torno de 25°C. Cerca de 0,1 g das amostras foram colocadas sobre a superfície do diamante para a realização da leitura. Antes de cada digitalização foi realizada a leitura do branco por meio de uma leitura sem amostra na superfície. Também foi realizada a análise de espectroscopia no MIR nos padrões autênticos (Sigma Aldrich) de ácido cafeico, catequina, epicatequina, quercetina, cinamaldeído, eugenol e cumarina seguindo o mesmo procedimento descrito acima. Os números de onda onde ocorreram as máximas absorbâncias das bandas dos espectros dos padrões serviram para o auxílio da seleção das variáveis das amostras de canela verdadeira e canela falsa.

4.10 Análises Quimiométricas

Os dados obtidos foram analisados utilizando o programa estatístico *Statistical Analysis System (SAS)® University Edition* para a ACP e o *software Chemoface* versão 1.63 (NUNES et al., 2012) para a PLS-DA.

4.10.1 Análise de Componentes Principais (ACP)

O número de componentes principais foi escolhido pela avaliação da variância cumulativa (soma dos CPs > 70%). A ACP também foi utilizada com o objetivo de descarte de variáveis, sendo descartadas as variáveis que apresentaram baixa correlação com os componentes principais de maior variância e correlação semelhante entre mais

de um destes, redundância. Foram utilizadas como variáveis as propriedades químicas dos extratos de canela e os valores de número e comprimento de onda associado as máximas absorbâncias das bandas observadas nos espectros da canela obtidos por MIR.

4.10.2 Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA)

A análise quimiométrica pela técnica de PLS-DA foi realizada utilizando o *software* Chemoface versão 1.63 (NUNES et al., 2012). Os dados foram aleatorizados e divididos em dois grupos utilizando o algoritmo KennardStone (KS) (KENNARD et al., 1969). O modelo de classificação foi otimizado por validação cruzada única utilizando um conjunto composto por 70% das amostras de cada classe. As demais amostras de cada classe (30%) foram utilizadas como conjunto de validação externa.

O desempenho dos modelos foi avaliado pela capacidade de classificar amostras de canela em verdadeira ou falsa através da sensibilidade e especificidade. A sensibilidade é a porcentagem de a canela verdadeira ser detectada corretamente em relação a todas as amostras de canela verdadeira no conjunto de teste. A especificidade é a porcentagem de amostras de canela falsa detectadas corretamente em relação a todas as amostras de canela falsa no conjunto de testes.

4.11 Comparação entre o método CLAE-DAD e o MIR

Após os resultados obtidos foi feita a comparação do método de CLAE-DAD com o MIR em relação ao desempenho e viabilidade para a diferenciação de amostras de canela verdadeira e falsa.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise visual das amostras de canela

De acordo com a triagem feita a partir da análise visual das amostras de canela 62% (80 amostras) foram diferenciadas como canela verdadeira e 38% (49 amostras) foram diferenciadas como amostras de canela falsa. As amostras de canela verdadeira têm como características coloração marrom clara, casca facilmente quebradiça e enrolada em várias camadas enquanto as amostras de canela falsa se diferenciam por apresentarem coloração mais escura e uma única camada grossa de casca sendo mais rígidas que canelas verdadeiras (Figura 7).

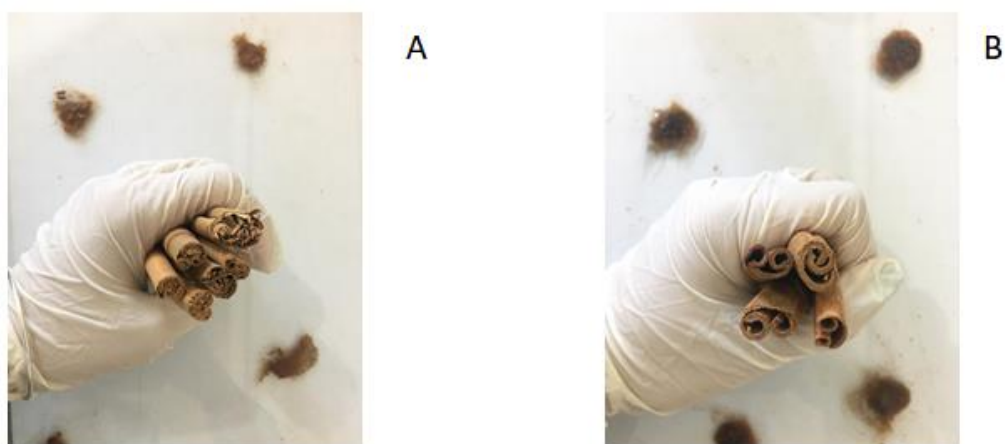


Figura 7- Aspecto visual da canela em casca. A) Canela verdadeira e B) canela falsa. Fonte: Própria autoria.

5.2 Teor de constituintes bioativos, atividade antioxidante e fenólicos por CLAE-DAD das amostras de canela

Os valores para o teor de CFT, FT, taninos condensados, atividade antioxidante por DPPH e BCAL, e os compostos fenólicos identificados por CLAE-DAD das amostras de canela verdadeira e falsa analisadas encontram-se apresentados na Tabela 5, com valores mínimos e máximos, as concentrações médias e desvios-padrão.

Tabela 5 – Valores obtidos pelos métodos de referência para as amostras de canela nos conjuntos de canela verdadeira e canela falsa.

Constituintes bioativos	Canela verdadeira			Canela falsa		
	R	Média	DS	R	Média	DS
CFT*	31,14-89,82	73,26	9,66	31,33-89,79	64,36	14,92
FT*	19,03-65,70	45,07	11,93	15,15-55,76	34,95	8,21
Taninos ^{ns}	72,04-234,9	163,45	14,54	89,34-217,13	147,84	35,22
Atividade antioxidante	R	Média	DS	R	Média	DS
DPPH*	0,61-0,93	0,79	0,06	0,47-0,82	0,68	0,1
BCAL*	0,37-0,92	0,78	0,13	0,11-0,92	0,61	0,22
Fenólicos CLAE-DAD	R	Média	DS	R	Média	DS
Eugenol*	0-89,89	6,53	19,53	Nd	Nd	Nd
Cinamaldeído*	51,50-88,23	71,64	9,11	32,50-77,33	64,29	10,88
Cumarina*	0-13,96	2,48	2,42	0,91-25-17	10,19	7,16
Quercetina ^{ns}	0-94,99	13,23	21,66	0,18-61,33	20,56	16,79
Epicatequina ^{ns}	0-67,55	13	14,43	0-45,98	15,5	12,56
Ácido cafeico ^{ns}	0-46,31	16,09	14,17	0-47,10	17,6	15,85
Catequina ^{ns}	0-53,12	10,93	12,27	0-52,0	10,79	12,27

n = 129 amostras.*=F significativo ao nível de 5%; ns= F não significativo ao nível de 5%.R, valores mínimos e máximos; DS, desvio padrão; CFT, constituintes fenólicos totais em mg GAE.g⁻¹ amostra; FT, Flavonoides totais em mg CE. g⁻¹ amostra; capacidade antioxidante por DPPH, em %inibição; BCAL, em % de proteção; Taninos, em mg CE. g⁻¹ amostra ; Eugenol, cinnamaldeído,cumarina, quercitina,epicatequina, ácido cafeico e catequina em mg. g⁻¹; Nd= não detectado.

A variabilidade do perfil de composição e a quantidade de componentes individuais são influenciadas por fatores como as diferenças das espécies, origem geográfica, tempo de colheita e condições de armazenamento (LI et al., 2013; BEHBAHANI et al., 2020). Amostras de canela verdadeira apresentaram significativamente maiores quantidades de constituintes fenólicos totais, flavonoides totais e maiores atividades antioxidantes DPPH e BCAL quando comparadas com amostras de canela falsa.

Os compostos fenólicos e flavonoides são os principais responsáveis pela inibição dos radicais livres devido a sua capacidade de doação de hidrogênio e estabilização do radical antioxidante via processo de ressonância do anel (SANTOS et

al., 2017; FARAG et al., 2018). A análise de DPPH indica a ação antioxidante primária por medir quanto de um radical livre pode ser inibido por um determinado composto, podendo ser inibidos por mecanismos de transferência de átomos de hidrogênio e transferência de elétrons simples. Os resultados demonstram alta capacidade antioxidante primária das amostras de canela verdadeira, em média, 79% enquanto as amostras de canela falsa apresentaram, em média, 68% de inibição.

A análise de percentual de proteção do sistema β - caroteno/ácido linoleico indica ação antioxidante secundária avaliando a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico (DUARTE et al., 2006). As amostras de canela verdadeira apresentaram, em média, 78% de proteção da oxidação das moléculas do sistema presente inibindo satisfatoriamente o efeito das condições favoráveis à oxidação que é inserido durante a análise.

Autores como Farag et al. (2018) indicam que a canela falsa apresenta maiores teores de taninos condensados quando comparada a canela verdadeira, entretanto não houve diferença significativa entre os resultados encontrados pela análise de taninos condensados. De acordo com Chen et al. (2014) pode ocorrer uma variação muito grande no perfil de composição das proantocianidinas nas espécies de canela, de maneira que, a canela verdadeira apresenta maiores teores de proantocianidina do tipo A enquanto a canela falsa apresenta maiores teores de proantocianidina do tipo B.

De acordo com a CLAE-DAD dos fenólicos, sete dos doze padrões indicados pela literatura (WANG et al., 2013; SANTOS et al., 2017; FARAG et al., 2018) foram detectados em pelo menos uma das variedade das amostras de canela sendo eles: eugenol, cinamaldeído, quercetina, cumarina, epicatequina, ácido cafeico e catequina. Entretanto alguns deles (quercetina, epicatequina e ácido cafeico) apresentaram quantidades maiores do que as citadas em literatura. Observando o conteúdo de fenólicos determinado pelo CLAE-DAD verifica-se que apesar da semelhança no perfil cromatográfico básico há diferença significativa nos teores de compostos marcadores como eugenol, cumarina e cinamaldeído sendo o último composto encontrado em ambas as variedades de canela.

Os teores de cinamaldeído e eugenol encontrados foram compatíveis com os valores relatados por Santos et al., (2017) .O eugenol foi detectado apenas em amostras de canela verdadeira estando totalmente ausente em amostras de canela falsa. Resultados semelhantes foram encontrados por Farag et al. (2018) que indicaram os

compostos eugenol e cinamaldeído como importantes marcadores químicos para a diferenciação entre as variedades de canela. O eugenol possui um alto poder antioxidante, apresenta atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral interferindo na fisiologia dos microrganismos e quando em combinação com outros compostos como o cinamaldeído possui um efeito sinérgico contra vários patógenos de maneira que a sua presença em cascas de canela eleva a qualidade da mesma (MARCHESE et al., 2017; PONCIANO et al., 2020).

A cumarina foi encontrada predominantemente em amostras de canela falsa assemelhando-se a resultados encontrados por Wang et al. (2013) onde espécies de canela falsa apresentaram alto teor de cumarina quando comparadas com espécies de canela verdadeira. Segundo a literatura a cumarina é o principal marcador químico de espécies de canela falsa e o seu alto teor está diretamente relacionado a canela de qualidade inferior e menor preço, sendo essas canelas de baixa qualidade utilizadas em fraudes de substituição de canela verdadeira por canela falsa (SANTOS et al., 2017; KAWATRA et al., 2015; NABAVI et al., 2015).

5.3 Espectroscopia de Infravermelho Médio- MIR

Os espectros de absorvâncias do MIR das 129 amostras de canela verdadeira e falsa encontram-se apresentados na Figura 8.

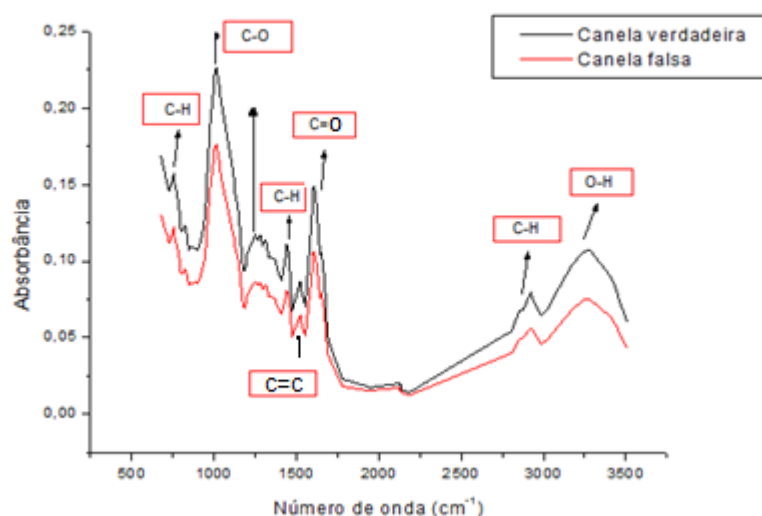


Figura 8- Espectros das médias das absorvâncias de amostras de canela verdadeira e canela falsa.

Os espectros obtidos através da espectroscopia de MIR evidenciaram sete bandas principais de absorção que estão associadas a grupos funcionais dos compostos majoritários da canela como carboidratos, proteínas, gorduras e polissacarídeos. Entretanto essa diferença de intensidade de absorbância observada vem das diferenças dos compostos minoritários, como os compostos fenólicos, que são encontrados em maiores quantidades em canela verdadeira. Dessa maneira, os grupos funcionais dos compostos fenólicos da canela identificados por CLAE-DAD (Tabela 6) foram associados a essas bandas.

Tabela 6- Principais regiões espectrais do MIR baseadas nos padrões de Ácido Cafeico, Catequina, Epicatequina, Quercetina, Cinamaldeído, Eugenol e Cumarina presentes nas amostras de canela.

Intervalo/frequência(cm^{-1})	Ligação	Grupos funcionais
3600-3200	O–H	Álcoois e fenóis
2970-2850	C–H	Alcanos
1600-1500	C=C	Anéis aromáticos
1760-1690	C=O	Aldeídos, cetonas
1452	C–H	Metila
1300-1050	C–O	Álcool/Éster
995-675	C–H	Alquenos

Fonte: SKOONG et al., 2009 adaptado

Verifica-se na Figura 8 que a canela verdadeira apresenta maior intensidade de absorbância quando comparado à canela falsa, indicando maior concentração dos compostos responsáveis pela absorção no MIR. A banda de 3500 a 3200 cm^{-1} indica vibrações do grupo O-H associado a compostos fenólicos como a epicatequina, catequina, quercetina, ácido cafeico e eugenol. A região 2970 a 2850 cm^{-1} refere-se à deformação axial da ligação C-H podendo se referir também ao grupo metila (CH_3) que também pode corresponder à faixa com número de onda de 1450 cm^{-1} . Esse grupo mostra uma absorção de média intensidade entre as bandas de 1475–1450 cm^{-1} , sofrendo uma vibração de deformação angular assimétrica estando associados à grupos

funcionais de compostos como cinamaldeído e eugenol. A região de 1760 a 1690 cm^{-1} corresponde a ligação C=O representando alta concentração de cinamaldeído e aldeídos, no entanto a ligação de C=O também está presente em compostos como cumarina, podendo ter ocorrido uma sobreposição. A absorção do espectro correspondente à região 1600 a 1500 cm^{-1} refere-se a ligações C=C de anéis aromáticos presentes na maioria dos compostos da canela. As bandas observadas entre 1300 a 1050 cm^{-1} , características dos álcool e éster, derivam da vibração de deformação axial de O-H e de COO ou C-O-C que estão associadas aos compostos fenólicos e flavonoides incluindo os taninos (SKOONG et al., 2009; LI et al., 2013 JEYARATNAM et al., 2016).

Os resultados obtidos são compatíveis com os espectros da canela encontrados por Sivakami et al., (2020) e por Behbahani et al., (2020) confirmando que a casca da canela em pó é rica em compostos fenólicos e aromáticos com maiores concentrações em espécies de canela verdadeira. No entanto, os espectros das amostras são bastante semelhantes, possuindo picos comuns entre os compostos. Isso está relacionado a similaridade na composição majoritária em termos de carboidratos, álcoois, gorduras, proteínas e polissacarídeos entre as amostras de canela verdadeira e falsa (SANTOS et al., 2017), tornando difícil a identificação da diferença dos componentes entre as amostras de canela.

5.4 Análise de Componentes Principais (ACP)

A Figura 9A apresenta o gráfico de dispersão das amostras de canela verdadeira e falsa pelos Componentes Principais (CPs), de acordo com os dados das análises de constituintes bioativos, atividade antioxidante DPPH e BCAL, e pelos marcadores químicos (eugenol, cinamaldeído e cumarina) identificados por CLAE-DAD. A Figura 9B apresenta o gráfico de dispersão das amostras de canela verdadeira e falsa pelos Componentes Principais (CPs), de acordo com os dados obtidos pelo MIR.

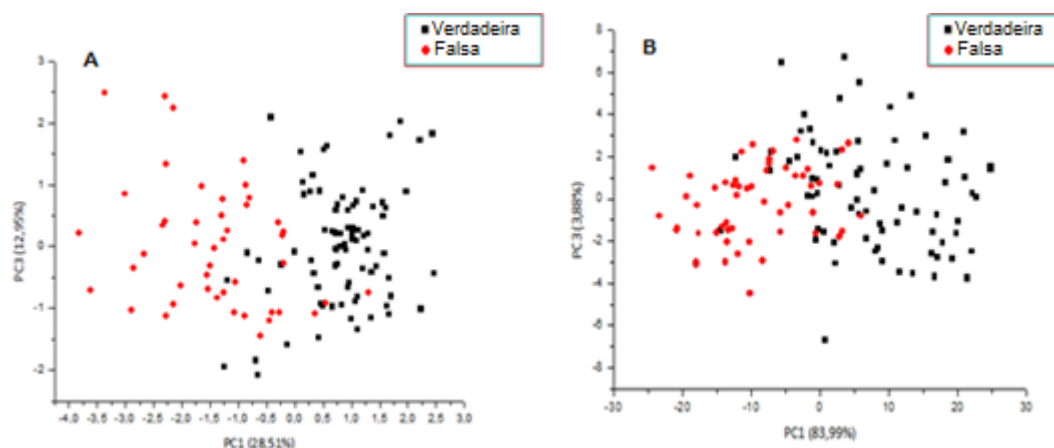


Figura 9- Gráfico de dispersão para a ACP das amostras de canela verdadeira e falsa: (A) utilizando dados obtidos pelas análises de constituintes bioativos, atividade antioxidante e CLAE-DAD; (B) utilizando dados obtidos por MIR.

De acordo com Figura 9A, foram necessários três componentes para explicar 70% da variabilidade dos dados sendo a distribuição gráfica dos escores de CP1 e CP3 responsáveis pela formação de dois grupos formados pelas amostras de canela falsa e verdadeira, respectivamente. O CP1 foi responsável por explicar 28,51% da variabilidade dos dados e está correlacionado positivamente com todas as variáveis, exceto para teor de cumarina, onde a correlação observada é negativa. As amostras de canela verdadeira se localizaram, principalmente, no quadrante positivo do CP1. Isso indica que apresentam maiores teores de constituintes fenólicos totais, flavonoides totais, atividade antioxidante DPPH e BCAL e teor de eugenol e menores teores de cumarina. Dessa maneira esses resultados estão de acordo com os resultados encontrados nas análises de compostos bioativos, atividade antioxidante e fenólicos por CLAE-DAD evidenciando que o índice multivariado é capaz de indicar se as amostras de canela são verdadeiras ou falsas. Baseado no gráfico (Figura 9A) amostras com escores de CP1 maiores que 0 são predominantemente amostras de canela verdadeira, valores menores do que 0 e maiores do que -1 indica uma zona de interseção entre os dois grupos onde pouco pode se dizer sobre a autenticidade da canela, indicando que a análise visual não é, muitas vezes, conclusiva. Valores menores que -1 estão predominantemente amostras de canela falsa.

Ainda em relação a Figura 9A, o CP3 explica 12,95% da variabilidade dos dados e está correlacionado positivamente com o teor de cumarina e negativamente com taninos condensados e cinamaldeído de maneira que as amostras que estão localizadas no quadrante negativo de CP3 apresentam maior teor de cinamaldeído e taninos condensados e menor teor de cumarina. Entretanto, o cinamaldeído apesar de ser

considerado um marcador químico da canela verdadeira, como mostrado em estudos realizados por Farag et al., (2018), não variou o suficiente para promover distinção entre as classes de canela verdadeira e falsa.

Quando o espectro MIR é avaliado (Figura 9B) verifica-se que houve a formação de dois grupos de amostras onde as espécies de canela verdadeira e canela falsa podem ser facilmente diferenciadas, essa separação ocorre no eixo do CP1 (83,99%). A soma do percentual de explicação da variabilidade dos espectros se concentrou nos três primeiros componentes (94,71 %) sendo possível a redução da dimensionalidade de 149 variáveis para apenas três variáveis, com menor perda de informação possível.

A maioria das variáveis apresentaram correlações altas e positivas exclusivamente com CP1 e correspondem às bandas de 1600 a 600 cm^{-1} que estão associadas às ligações C=O, C=C, C-H e C-O dos grupos funcionais de compostos fenólicos e aromáticos como cinamaldeído, epicatequina, quercetina e eugenol. As demais variáveis se correlacionam positivamente com ambos os Componentes Principais (CP1 e CP3) e correspondem às bandas na faixa de 2850 a 2970 cm^{-1} e 3500 a 3200 cm^{-1} , associadas às ligações C-H e O-H dos grupos funcionais de compostos fenólicos e flavonoides como epicatequina, ácido cafeico, cumarina e taninos condensados.

Os resultados indicam que as diferenças de composição entre os diferentes tipos de canela foram capazes de promover a separação das amostras de canela verdadeira e falsa. As amostras de canela verdadeira foram localizadas, principalmente, no quadrante positivo de CP1. Dessa maneira, amostras de canela com escores de CP1 maior que 5 apresentam características de canela verdadeira, valores entre -5 e 5 representam uma faixa de transição, onde coexistem as amostras de canela verdadeira e canela falsa, valores abaixo de -5 observa-se predominantemente amostras de canela falsa. Li et al., (2013) utilizando o MIR associado à ACP em nove amostras de canela, sendo uma verdadeira e oito falsas, encontrou resultados similares ao observado nesse estudo.

Amostras de canela verdadeiras possuem em sua grande maioria maiores teores de compostos que permitem uma maior atividade antioxidante e apresentam um baixo teor de cumarina estando em um nível superior de qualidade quando comparadas com amostras de canela falsa. Entretanto algumas amostras de canela verdadeira podem apresentar um baixo teor desses compostos como mostrado na Figura 9. Essa

variabilidade no perfil de composição dessas canelas verdadeiras que apresentaram características de falsa pode ser justificada por fatores relacionados às condições de processamento e de armazenamento dos comerciantes onde podem ocorrer por exemplo a perda de compostos voláteis, como eugenol (SANTOS et al., 2017; FARAG et al., 2018).

5.5 Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA)

Um modelo binário não-direcionado para a classificação de amostras de canela verdadeira e canela falsa baseado nas análises de constituintes bioativos, atividade antioxidante, e pelos marcadores químicos (eugenol, cinamaldeído e cumarina) identificados por CLAE-DAD, e na análise realizada no MIR foi desenvolvido e validado. O modelo foi avaliado por análises de validação interna seguidas de análises de validação externa, onde um conjunto de novas amostras foi inserido e a aplicabilidade prática do modelo foi testada. Os parâmetros de ajustes dos modelos estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Capacidade de classificação, sensibilidade e seletividade dos modelos binários para amostras de canela verdadeira e canela falsa gerados com dados de constituintes bioativos, atividade antioxidante, e CLAE-DAD e dados gerados por MIR.

Dados utilizados	Treinamento			Validação		
	Acerto (%)	Sensitividade (%)	Especificidade (%)	Acerto (%)	Sensitividade (%)	Especificidade (%)
Cb;Aa e CLAE-DAD	94,44	94,54	94,28	78,94	75,0	85,71
MIR	100	100	100	78,94	87,5	64,28

Cb= contituientes bioativos e Aa= atividade antioxidante.

Os modelos calibrados utilizando a técnica de PLS-DA apresentaram boa taxa de classificação correta de amostras de canela verdadeira e canela falsa. Os modelos apresentaram bons percentuais de acerto (acima de 70%) , sensibilidade e especificidade na calibração. Os resultados coincidem com o estudo feito por Farag et a.l, (2018) onde foi encontrado 77% de acertos utilizando a mesma técnica (PLS-DA) com o intuito de discriminação de canela verdadeira e canela falsa.

Os gráficos com os coeficientes de regressão em função das variáveis para os modelos estão apresentados na Figura 10.

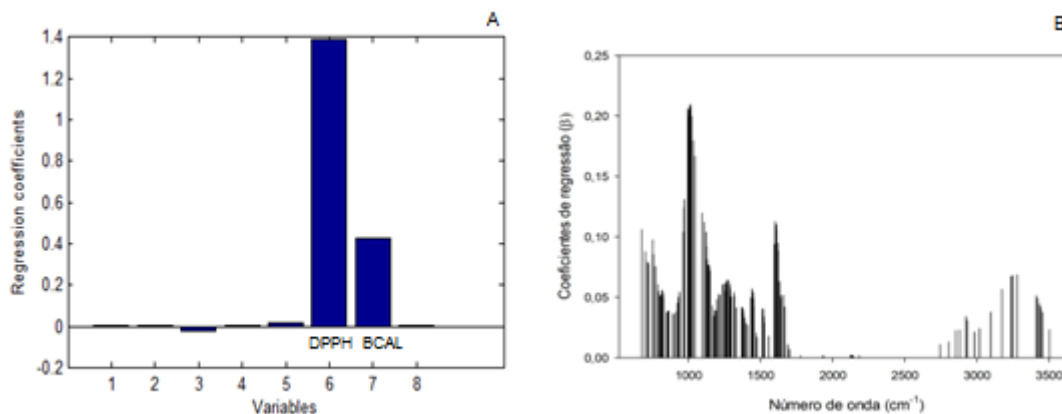


Figura 10 - Coeficientes de regressão em função das variáveis dos modelos PLS-DA construídos para classificar amostras de canela como verdadeira ou falsa. A: Modelo calibrado com dados de análises de composição; B: Modelo calibrado com dados do MIR

A variável de maior relevância para o modelo calibrado com dados de análises de constituintes bioativos, atividade antioxidante, e pelos marcadores químicos identificados por CLAE-DAD é a capacidade antioxidante DPPH e BCAL (Figura 10A). De forma geral, as amostras de canela verdadeira apresentaram maior capacidade antioxidante em relação as amostras de canela falsa. Esses dados estão de acordo com os obtidos nas análises e também se assemelham aos resultados observados por Prasad et al. (2009).

As variáveis de maior relevância para o modelo calibrado com dados do MIR são relacionadas aos seguintes números de onda: região entre 1600 e 1500 cm^{-1} , região entre 1300 e 1000 cm^{-1} e região entre 800 e 600 cm^{-1} (Figura 10B). Portanto amostras de canela verdadeira possuem maior intensidade de absorbância nesses pontos, indicando ter maior conteúdo de compostos a eles relacionados. A região de vibração de 1600 a 1500 cm^{-1} corresponde a vibração de grupos C=C de anéis aromáticos presentes na maioria dos compostos da canela como cinamaldeído. Os espectros de bandas 1300 a 1000 cm^{-1} , características dos álcool e éster representam os compostos fenólicos da canela. A região entre 800 e 600 cm^{-1} está associada a vibração de alquenos e anéis aromáticos (BARBOSA, 2007). Autores como Li et al., (2013) e Farag et al.,(2018) indicaram diferenças entre o conteúdo de compostos aromáticos em amostras de canela verdadeira e canela falsa.

O MIR se destaca por ser uma análise rápida e requerer preparo mínimo da amostra fornecendo uma grande quantidade de informações com apenas um teste dispensando o uso de reagentes químicos utilizados no CLAE-DAD. Dessa maneira diante da semelhança dos parâmetros de ajustes, da alta capacidade preditiva e avaliando a complexidade da realização das análises para a obtenção dos conjuntos de dados, verifica-se que o MIR é apropriado como forma de controle de qualidade para diferenciação de amostras de canela verdadeira e falsa, apresentando maior viabilidade e desempenho comparado com o CLAE-DAD.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos pelo CLAE-DAD, o eugenol, o cinamaldeído e a cumarina são os marcadores químicos na diferenciação de canela verdadeira e falsa.

Os resultados obtidos das análises de constituintes bioativos, atividade antioxidante e MIR, associadas à quimiometria foram eficazes na diferenciação das classes de canela verdadeira e falsa. A ACP mostrou de forma clara a separação de dois grupos de canela permitindo avaliar as principais análises, os marcadores químicos e os grupos funcionais dos compostos característicos na diferenciação e evidenciando que o índice multivariado é capaz de identificar se as amostras de canela são verdadeiras ou falsas. A PLS-DA foi eficaz na diferenciação das classes de canela verdadeira e falsa determinando a qual classe pertence uma amostra desconhecida a partir das informações fornecidas ao sistema.

O MIR associado à quimiometria fornece uma alternativa estratégica, em comparação com o CLAE-DAD, para adiferenciação rápida e fácil de amostras de canela verdadeira e falsa. Essa abordagem é viável para análise de amostras de canela de outras fontes podendo ser aplicada para explorar outros fatores como métodos de processamento e condições de armazenamento.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, R.A. Isolation and characterization of polyphenol-type-Apolymers from cinnamon with insulin-like biological activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p. 65-70, 2004.

BARBOSA, L. C. de A. Espectroscopia no Infravermelho na caracterização de compostos orgânicos. 1ª Ed ed. Viçosa: **Editora UFV**, 2007.

BEHBAHANI, A. B.; FALAH, F.; ARAB, L. F.; VASIEE, M.; YAZDI, T. F.; Chemical Composition and Antioxidant, Antimicrobial, and Antiproliferative Activities of *Cinnamomum zeylanicum* Bark Essential Oil. **Hindawi Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2020.

BERNARD, D.; KWABENA, A.I.; OSEI, O.D.; DANIEL, G.A.; ELOM, S.A.; SANDRA, A. The Effect of Different Drying Methods on the Phytochemicals and Radical Scavenging Activity of Ceylon Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) Plant Parts. **Eur. J. Med. Plants**, v. 4, p. 1324–1335, 2014.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007. Dispõe sobre o “Regulamento Técnico sobre aditivos aromatizantes”. **Diário Oficial República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 17 jan. 2017.

CHEN, P.; SUN, J.; FORD, P.; Differentiation of the Four Major Species of Cinnamons (*C. burmannii*, *C. verum*, *C. cassia*, and *C. loureiroi*) Using a Flow Injection Mass Spectrometric (FIMS) Fingerprinting Method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, p. 2516-2521, 2014.

DING, Y.; WU, Q. E.; LIANG, C.; CHEN, J.; TRAN, N. M.; HONG, H. C.; JANG, Y.; PARK, L. K.; KIHWA, B.; KIM, H.Y.; KANG, S.J.; Discrimination of cinnamon bark and cinnamon twig samples sourced from various countries using HPLC-based fingerprint analysis. **Food Chemistry**, v. 127, p.755-760, 2011.

DUARTE, C. R.; Estudo dos compostos bioativos em especiarias (*Syzygium aromaticum* L, *Cinnamomum zeylanicum* Blume e *Myristica fragrans* Houtt) processadas por radiação ionizante. Tese (Doutorado em ciências na área de tecnologia nuclear). **Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares de São Paulo**, 2014.

European Food Safety Authority, E. Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food (AFC) on a request from the Commission related to Coumarin; adopted on 6 October 2004. **The EFSA Journal**, v.104, p.1–36, 2004.

FAO—Food and Agriculture Organization of the United Nations. Acesso em set. 2020.

FARAG, A. M.; LABIB, M. R.; NOLETO, C.; PORZEL, A.; WESSJOHANN, A. L.; NMR approach for the authentication of 10 cinnamon spice accessions analyzed via chemometric tools. **LWT- Food Science and Technology**, v.90, p.491-498, 2018.

FONTES, V.; PEREIRA, C. D.; PUPIN, B.; SAKANE, K. K.; Aplicação de espectroscopia no infravermelho: como ferramenta para análise quantitativa de orégano. **Revista Univap**, v.26, 2020.

GALVIN-KING, P.; HAUGHEY, A. S.; ELLIOTT, T. C.; Herb and spice fraud; the drivers, challenges and detection. **Food Control**, v.88, p.85-87, 2018.

JEYARATNAM, N.; NOUR, H. A.; KANTHASAMY, R.; NOUR, H.A.; YUVARAJ, R. A.; AKINDOYO, O. J.; Essential oil from *Cinnamomum cassia* bark through hydrodistillation and advanced microwave assisted hydrodistillation. **Industrial Crops and Products**, v.92, p.57-66, 2016.

KAWATRA, P.; RAJAGOPALAN, R.; Cinnamon: Mystic powers of a minute ingredient. **Phcog Res**, v.7, p.1-6, 2015.

KENNARD, R. W.; STONE, L. A. Computer Aided Design of Experiments. **Technometrics**, v. 11, n. 1, p. 137–148, 1969.

KRUGER, S.; WINHEIM, L.; MORLOCK, E. G.; Planar chromatographic screening and quantification of coumarin in food, confirmed by mass spectrometry. **Food Chemistry**, v.239, p.1182-1191, 2018.

LI, Y.; KONG, D.; WU, H.; Analysis and evaluation of essential oil components of cinnamon barks using GC-MS and FTIR spectroscopy. **Industrial Crops and Products**, v.41, p.269-278, 2013.

LOHUMI, S. H.; LEE, S.; LEE, H.; CHO, B-K. A review of vibrational spectroscopic techniques for the detection of food authenticity and adulteration. **Trends in Food Science e Technology**, v. 46, p. 85-98, 2015.

MARCHESE, A., BARBIERI, R., COPPO, E., ORHAN, E. I., DAGLIA, M., NABAVI, F. S., IZADI, M., ABDOLLAHI, M., NABAVI, M.S., AJAMI, M. Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic view point. **Critical Reviews in Microbiology**. v.43:6, p.668-689, 2017.

MIELKE, H., ABRAHAM, K., GÖTZ, M., VIETH, B., LAMPEN, A., LUCH, A., E GUNDERT-REMY, U. Physiologically based toxicokinetic modelling as a tool to assess target organ toxicity in route-to-route extrapolation-The case of coumarin. **Toxicology Letters**, v. 202, p. 100–110, 2011.

MINGOTI, S. A. Análise de dados através de métodos de estatística multivariada: uma abordagem aplicada. Belo Horizonte: **Editora UFMG**, p.297, 2005.

MOLYNEUX, P. The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 211–219, 2004.

NABAVI, F. S.; LORENZO, D. A.; IZADI, M.; SÁNCHEZ, S. E.; DAGLIA, M.; NABAVI, M. S.; Antibacterial Effects of Cinnamon: From Farm to Food, Cosmetic and Pharmaceutical Industries. **Nutrients**, v.7, p. 7729-7748, 2015.

NUNES, C. A.; FREITAS, M. P.; PINHEIRO, A. C. M.; BASTOS, S. C. Chemoface: A novel free user-friendly interface for chemometrics. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 11, p. 2003–2010, 2012.

PACHECO, J.; CASADO, S.; PORRAS, S. Exact methods for variable selection in principal component analysis: Guide functions and pre-selection. **Computational Statistics and Data Analysis**, v.57, p. 95–111, 2013.

PONCIANO, S. C. R.; MARTINS, R. G.; IULIANELLI, V. C. G.; TAVARES, B.I. M.; Estudo do extrato da canela por NMR em solução. **Brazilian Journal of Development**, v.6, 2020.

PRASAD, K. N.; YANG, B.; DONG, X.; JIANG, G.; ZHANG, H.; XIE, H.; JIANG, Y. Flavonoid contents and antioxidant activities from *Cinnamomum* species. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 10, n. 4, p. 627–632, 2009.

PROCOPIO, R. F.; Micropartículas lipídicas contendo óleo resina de casca de canela (*Cinnamomum zeylanicum* & *cassia* L.): produção, caracterização e estabilidade. Dissertação (mestrado em Engenharia de Alimentos). **Universidade Estadual de Campinas, 2018.**

REISSIG, N. G.; Fraudes em Alimentos: Tipos e Detecção. Trabalho acadêmico apresentado ao curso de Bacharelado em Química de Alimentos. **Universidade Federal de Pelotas**, p.11-24, 2009.

RODIONOVA, O. Y.; TITOVA, A. V.; POMERANTSEV, A. L. Trends in Analytical Chemistry Discriminant analysis is an inappropriate method of authentication. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 78, p. 17–22, 2016.

SALOMÃO, K.; Conheça a rota das especiarias. **Revista Globo Rural** 2014 [acesso 2018out.01]. Disponível em: [https://revistagloborural.globo.com/Noticias/noticia/2014/02/conheca-rota-das-especiarias.html].

SAKANAKA, S.; TACHIBANA, Y.; OKADA, Y. Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). **Food Chemistry**, v. 89, n. 4, p. 569–575, 2005.

SANTOS, R. R.; ANDRADE, M.; MADELLA, D.; MARTINAZZO, P.A.; MOURA, G. A. L.; MELO, R. N.; SILVA, S. A. Revisiting na ancient spice with medicinal purposes: Cinnamon. **Trends in Food Science & Technology**, v.62, p. 154-169, 2017.

SHARIF, K.M.; EJAZ, R.; PASHA, I. Nutritional and Therapeutic Potential of Spices. **In book: Therapeutic, Probiotic, and Unconventional Foods**, p.181-19, 2018.

SILVA, T. L. M.; BERNARDO, S. A. M.; SINGH, J.; MESQUITA, F. M. Beneficial Uses of Cinnamon in Health and Diseases: An Interdisciplinary Approach. **The Role of Functional Food Security in Global Health**, p.565-576, 2019.

SILVIS, J. C. I.; RUTH, M. S.; KLERX, F. J. H.; LUNING, A. P.; Assessment of food fraud vulnerability in the spices chain: na explorative study. **Food Control**, v.81, p.80-87, 2017.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, n. 1974, p. 152–178, 1998.

SIVAKAMI, M.; DEVI, R. K.; RENUKA, R.; THILAGAVATHI, T.; Green synthesis of magnetic nanoparticles via *Cinnamomum verum* bark extract for biological application. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 5, 2020.

SKOONG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. Princípios de Análise Instrumental. 6ª ed. Porto Alegre: **Editora Bookman**, 2009.

SOUZA, B. V. Extração e encapsulação por coacervação complexa das proantocianinas da canela (*Cinnamomum zeylanicum Blume*). **Universidade de São Paulo**, Pirassununga, 2016.

SPINK, J.; MOYER, C. D.; Defining the Public Health Threat of Food Fraud. **Journal of food Science**, v.76, p.157-163, 2011.

SPINK, J.; MOYER, C. D.; PARK, H.; WU, Y.; FERSHT, V.; SHAO, B.; HONG, M.; PAEK, Y. S.; EDELEV, D.; Introducing Food Fraud including translation and interpretation to Russian, Korean, and Chinese languages. **Food Chemistry**, v.189, p.102-107, 2015.

WANG, R.; WANG, R.; YANG, B.; Extraction of essential oils from five cinnamon leaves and identification of their volatile compound compositions. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.10, p.289-292, 2009.

WANG, H. Y.; AVULA, B.; NANAYAKKARA, D. P. N.; ZHAO, J.; KHAN, A. I.; Cassia Cinnamon as a Source of Coumarin in Cinnamon-Flavored Food and Food Supplements in the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2013.

YUN, W. J.; YOU, R. J.; KIM, S. Y.; KIM, H. S.; CHO, Y. E.; YOON, H. J.; KWON, E.; JANG, J. J.; PARK, S. J.; KIM, C. H.; CHE, H. J.; KANG, C. B.; In vitro and in vivo safety studies of cinnamon extract (*Cinnamomum cassia*) on general and genetic toxicology. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.95, p.115-123, 2018.